

Aprilie 2022

Instrucțiuni de utilizare QuantiFERON[®] SARS-CoV-2 ELISA Kit



Versiunea 1



A se utiliza pentru diagnosticarea in vitro

Pentru utilizare cu tuburile QuantiFERON[®] SARS-CoV-2 Blood
Collection Tube



626420



QIAGEN, 19300 Germantown Road, Germantown, MD 20874, SUA
Telefon: +1-800-426-8157



QIAGEN GmbH
QIAGEN Strasse 1, 40724
Hilden, Germania



1124420RO

Cuprins

| | |
|---|----|
| Domeniul de utilizare | 5 |
| Utilizatori potențiali | 6 |
| Descrierea și principiul | 7 |
| Rezumat și explicații | 7 |
| Materiale furnizate | 9 |
| Conținutul kitului..... | 9 |
| Componentele kitului..... | 10 |
| Platformă și software..... | 10 |
| Materiale necesare, dar nefurnizate | 11 |
| Reactivi suplimentari | 11 |
| Echipamente | 11 |
| Avertismente și precauții | 12 |
| Informații de siguranță..... | 12 |
| Precauții | 13 |
| Depozitarea și manipularea reactivilor..... | 16 |
| Stabilitatea în utilizare | 16 |
| Reactivii reconstituiți și neutilizați | 16 |
| Depozitarea și manipularea speci­menelor..... | 17 |
| Procedură: Efectuarea testului ELISA | 18 |
| Protocol: IFN- γ ELISA | 18 |
| Rezultate (calcul)..... | 24 |
| Generarea curbei standard și a valorilor probelor | 24 |

| | |
|---|-----------|
| Controlul calității testului | 26 |
| Interpretarea rezultatelor | 28 |
| Limitări | 29 |
| Caracteristicile de performanță ale testului..... | 30 |
| Performanță analitică | 30 |
| Performanță clinică..... | 39 |
| Referințe..... | 46 |
| Ghid de depanare..... | 51 |
| Simboluri | 54 |
| Date de contact | 55 |
| Anexa A: Informații tehnice..... | 56 |
| Rezultate neconcludente..... | 56 |
| Probe de plasmă coagulate | 56 |
| Probe de plasmă lipemice | 56 |
| Anexa B: Procedura de testare ELISA pe scurt..... | 57 |
| Informații pentru comandă..... | 59 |
| Istoricul modificărilor documentului | 60 |

Domeniul de utilizare

Testul QuantiFERON SARS-CoV-2 este un test de diagnosticare in vitro conceput pentru detecția calitativă a interferonului γ (IFN- γ) produs de celulele T CD4+ și CD8+ ca răspuns la stimularea prin intermediul unui amestec de peptide SARS-CoV-2 în sângele integral heparinizat. Cantitatea de IFN- γ produsă este măsurată utilizând testul de imunoabsorbție enzimatică (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay, ELISA).

Testul QuantiFERON SARS-CoV-2 este destinat să ajute la evaluarea răspunsului imun mediat celular (Cell-Mediated Immune, CMI) la persoanele fără antecedente de infecție cu SARS-CoV-2 și care au beneficiat de vaccinare împotriva COVID-19 folosind vaccinuri care vizează proteina virală spike (S) proteină a virusului SARS-CoV-2.

Testul QuantiFERON SARS-CoV-2 trebuie utilizat împreună cu alte teste de laborator și evaluare epidemiologică/clinică pentru a evalua răspunsul imun al unei persoane la vaccinarea împotriva COVID-19.

Dezvoltarea unor răspunsuri imune la celulele T poate dura câteva zile după vaccinare, deși durata de timp în care sunt prezente răspunsurile imune la celulele T nu este caracterizată clar la indivizii vaccinați.

Rezultatele nereactive nu exclud infecția activă cu SARS-CoV-2 și nu determină eficacitatea vaccinurilor împotriva COVID-19. Dacă se suspectează o infecție activă, confirmați prin utilizarea unui alt test molecular sau antigen pentru SARS-CoV-2. Rezultatele testului trebuie întotdeauna utilizate împreună cu examenul clinic, istoricul medical al pacientului și alte informații.

A se utiliza pentru diagnosticarea in vitro.

Utilizatori potențiali

Acest kit este destinat uzului profesional.

Produsul va fi utilizat doar de personal instruit și format special în tehnicile de biologie moleculară, care este familiarizat cu această tehnologie.

Descrierea și principiul

Rezumat și explicații

QuantIFERON SARS-CoV-2 (QFN SARS) este un test calitativ care utilizează tuburi specializate de recoltare a sângelui, care conțin antigeni peptidici care stimulează celulele imune folosind proteine specifice SARS-CoV-2. Perioada de incubare a sângelui în tuburi este cuprinsă între 16 și 24 de ore, după care, plasma este recoltată și testată pentru prezența IFN- γ rezultat ca răspuns la antigenii peptidici. Răspunsurile specifice mediate de celule T la infecția cu SARS-CoV-2 au fost raportate după vaccinare cu diferite tipuri de vaccinuri care vizează proteina spike [1–34].

Mai întâi, sângele integral este recoltat în fiecare dintre tuburile QuantiFERON SARS-CoV-2 Blood Collection Tube, și anume un tub Nil, un tub Ag1, un tub Ag2 și un tub Mitogen. Alternativ, sângele poate fi recoltat într-un singur tub de recoltare a sângelui cu litu-heparină sau heparină sodică pe post de anticoagulant, după care poate fi transferat în tuburile QuantiFERON SARS-CoV-2 Blood Collection Tube.

Tuburile QuantiFERON SARS-CoV-2 Blood Collection Tube sunt agitate pentru omogenizarea antigenului cu sângele și trebuie incubate la $37\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$ cât mai curând posibil, în interval de 16 ore de la recoltare. După o perioadă de incubare de 16 până la 24 de ore, tuburile sunt centrifugate, plasma este procesată, iar cantitatea de IFN- γ (UI/ml) este măsurată cu ajutorul testului ELISA. Testul QuantiFERON SARS-CoV-2 ELISA utilizează standard IFN- γ uman recombinant, acesta fiind comparat cu un preparat IFN- γ de referință (Ref NIH: Gxg01-902-535). Rezultatele probelor testate sunt raportate în Unități Internaționale pe ml (UI/ml) având ca referință o curbă standard preparată prin testarea diluțiilor standardului furnizat împreună cu kitul.

Se cunoaște că anticorpii heterofili (de ex., umani anti-șoareci) din serul sau plasma unor persoane provoacă interferență cu testele imune. Efectul anticorpilor heterofili din QuantiFERON SARS-CoV-2 ELISA este minimizat prin adăugarea de ser normal de șoarece în Diluantul verde și prin utilizarea de fragmente de anticorpi monoclonali F(ab')₂, ca anticorpi de captură a IFN- γ atașați la godeurile microplăcii.

Proba de plasmă din tubul Mitogen are rol de control pozitiv al IFN- γ pentru fiecare specimen testat. Tubul Nil se ajustează pentru fond (de ex., niveluri ridicate de IFN- γ circulatorii sau prezența anticorpilor heterofili). Nivelul IFN- γ din tubul Nil este scăzut din nivelul IFN- γ din tuburile Ag1, Ag2 și Mitogen.

Materiale furnizate

Conținutul kitului

| Componente ELISA | Kit cu 2 placă |
|---|---|
| Nr. de catalog | 626420 |
| Microplate Strips (Stripuri de microplăci) (12 × 8 godeuri) acoperite cu anticorpi monoclonali murini anti umani IFN- γ | 2 seturi de stripuri de microplăci 12 x 8 |
| IFN- γ Standard, liofilizat (conține IFN- γ uman recombinant, cazeină bovină, timerosal 0,01 % m/v) | 1 x flacon (8 UI/ml după reconstituire) |
| Green Diluent (Diluant verde; conține cazeină bovină, ser normal de șoarece, timerosal 0,01% m/v) | 1 × 30 ml |
| Conjugate 100x Concentrate (Conjugat concentrat 100x), liofilizat (HRP IFN- γ anti uman murin, conține timerosal 0,01 % m/v) | 1 × 0,3 ml (după reconstituire) |
| Wash Buffer 20× Concentrate (Soluție tampon pentru spălare concentrată 20×) (pH 7,2, conține ProClin® 300 0,05% v/v) | 1 × 100 ml |
| Enzyme Substrate Solution (Soluție de substrat enzimatic) (conține H ₂ O ₂ , 3,3', 5,5', tetrametilbenzidină) | 1 × 30 ml |
| Enzyme Stopping Solution (Soluție de inhibitor enzimatic) (conține H ₂ SO ₄ 0,5 M)* | 1 × 15 ml |
| <i>Instrucțiuni de utilizare QuantiFERON SARS-CoV-2 ELISA Kit</i> | 1 |

* Conține acid sulfuric

Componentele kitului

Substanțe de control și calibratoare

Testul QFN SARS ELISA utilizează standard IFN- γ uman recombinant, acesta fiind comparat cu un preparat IFN- γ de referință (Ref NIH: Gxg01-902-535).

Platformă și software

QFN SARS Analysis Software este opțional și poate fi utilizat pentru analiza datelor brute și calcularea rezultatelor. Software-ul poate fi descărcat de pe pagina **www.qiagen.com**.

Materiale necesare, dar nefurnizate

Reactivi suplimentari

- Apă deionizată sau distilată, 2 litri

Echipamente*

- Incubator la 37 ± 1 °C (cu sau fără CO₂)
- Pipete cu volum variabil calibrate pentru eliberarea a 10 µl până la 1.000 µl, cu vârfuri de unică folosință
- Pipete multicanal calibrate, capabile să elibereze 50 µl și 100 µl, cu vârfuri de unică folosință
- Agitator pentru microplăci, capabil de rotații de la 500 până la 1.000 rot/min.
- Spălător pentru microplăci (pentru siguranța manipulării probelor de plasmă, se recomandă un spălător automat pentru plăci)
- Cititor pentru microplăci prevăzut cu un filtru de 450 nm și un filtru de referință de 620 nm până la 650 nm
- Vortexer cu rotație variabilă
- Centrifugă cu capacitate de centrifugare a tuburilor de recoltare a sângelui la minimum 3.000 RCF (g)
- Cilindru gradat, 1 litru sau 2 litri
- Capac placă
- Prosoape absorbante fără scame

* Înainte de utilizare, asigurați-vă că instrumentele au fost verificate și calibrate în conformitate cu recomandările producătorului.

Avertismente și precauții

Pentru clienții din Uniunea Europeană, vă rugăm să rețineți că aveți obligația de a raporta incidentele grave survenite în legătură cu dispozitivul către producător și autoritatea competentă a statului membru în care își are sediul/domiciliul utilizatorul și/sau pacientul.


Informații de siguranță

Atunci când lucrați cu substanțe chimice, utilizați întotdeauna un halat de laborator, mănuși de unică folosință și ochelari de protecție adecvate. Pentru informații suplimentare, vă rugăm să consultați fișele cu date de securitate (Safety Data Sheet, SDS) corespunzătoare. Acestea sunt disponibile online în format PDF ușor de utilizat și compact, la adresa **www.qiagen.com/safety**, unde puteți găsi, vizualiza și tipări fișa cu date de securitate (Safety Data Sheet, SDS) a fiecărui kit și componente ale kitului QIAGEN.

- Toate substanțele chimice și materialele biologice sunt potențial periculoase. Specimenele și probele sunt potențial infecțioase și trebuie tratate ca materiale periculoase din punct de vedere biologic.
- Aruncați deșeurile de probe și de test în conformitate cu procedurile locale de siguranță.
- Specimenele și probele sunt potențial infecțioase. Aruncați deșeurile de probe și de test în conformitate cu procedurile locale de siguranță.
- Testul QFN SARS trebuie utilizat împreună cu alte teste de laborator și evaluare epidemiologică/clinică pentru a evalua răspunsul imun al unei persoane la vaccinarea împotriva COVID-19.

- Un rezultat QFN SARS nereactiv nu exclude posibilitatea infecției cu SARS-CoV-2 și nu determină eficacitatea vaccinurilor împotriva COVID-19. Rezultatele fals nereactive pot fi cauzate de manipularea incorectă a tuburilor de recoltare a sângelui după puncție venoasă, efectuarea incorectă a testului sau de alte variabile imunologice individuale, inclusiv cele legate de posibile comorbidități. Producția de anticorpi heterofili sau IFN- γ nespecific din alte afecțiuni inflamatorii poate masca răspunsurile specifice la peptidele SARS-CoV-2.
- Un rezultat QFN SARS reactiv nu trebuie considerat ca bază unică și definitivă pentru determinarea eficacității vaccinului împotriva COVID-19. Efectuarea incorectă a testului poate duce la rezultate fals reactive la QFN SARS.
- Un rezultat fals reactiv la QFN SARS poate fi cauzat de recoltarea incorectă a probei de sânge sau de manipularea necorespunzătoare a specimenului, care afectează funcția limfocitelor. Consultați secțiunea „Procedură: Efectuarea testului ELISA”, pagina 18 pentru manipularea corectă a specimenelor de sânge. Întârzierea incubăției poate cauza rezultate fals nereactive sau neconcludente, iar alți parametri tehnici pot afecta capacitatea de a detecta un răspuns IFN- γ semnificativ.
- Un răspuns slab la Mitogen ($< 0,5$ UI/ml) indică un rezultat neconcludent atunci când o probă de sânge are, de asemenea, un răspuns nereactiv la proteinele SARS-CoV-2. Acest comportament poate apărea în caz de limfocite insuficiente, activitate scăzută a limfocitelor, ca urmare a manipulării necorespunzătoare a specimenului, umplerii/omogenizării incorecte a tubului Mitogen sau a incapacității limfocitelor pacientului de a produce IFN- γ . Nivelurile ridicate de IFN- γ în proba Nil pot apărea odată cu prezența anticorpilor heterofili sau la secretarea intrinsecă a IFN- γ .

Precauții

| | |
|---|---|
| <p>ATENȚIE</p>  | <p>Manipulați sângele uman ca și cum ar avea potențial infecțios.</p> <p>Urmați îndrumările relevante referitoare la manipularea sângelui. Eliminați probele și materialele care au intrat în contact cu sângele sau cu produsele pe bază de sânge în conformitate cu reglementările locale și naționale.</p> |
|---|---|

QuantIFERON Enzyme Stopping Solution



Conține: acid sulfuric. Avertisment! Poate fi corosiv pentru metale. Provoacă iritarea pielii. Provoacă o iritare gravă a ochilor. Purtați mănuși de protecție/îmbrăcăminte de protecție/ochelari de protecție/mască de protecție.

QuantIFERON Enzyme Substrate Solution

Avertisment! Provoacă iritarea ușoară a pielii. Purtați mănuși de protecție/îmbrăcăminte de protecție/ochelari de protecție/mască de protecție.

QuantIFERON Green Diluent



Conține: tartrazină. Avertisment! Poate provoca o reacție alergică a pielii. Purtați mănuși de protecție/îmbrăcăminte de protecție/ochelari de protecție/mască de protecție.

QuantIFERON Wash Buffer 20x Concentrate

Nociv pentru mediul acvatic cu efecte pe termen lung. A se evita aruncarea în mediul înconjurător.

Informații suplimentare

Fișe cu date de securitate (Safety Data Sheets, SDS): www.qiagen.com/safety

- Timerosalul este utilizat pe post de conservant în unii reactivi QFN SARS. Acesta poate fi toxic la ingerare, inhalare sau în contact cu pielea.
- Abaterile de la *Instrucțiunile de utilizare QuantiFERON ELISA Kit* pot genera rezultate incorecte. Vă rugăm să citiți cu atenție instrucțiunile înainte de utilizare.
- Nu utilizați trusa dacă unul dintre flacoanele de reactivi prezintă semne de deteriorare sau scurgeri înainte de utilizare.
- **Important:** Inspectați flacoanele înainte de utilizare. Nu utilizați Conjugat sau Standard IFN- γ dacă flacoanele prezintă semne de deteriorare sau dacă sigiliul de cauciuc a fost compromis. Nu manipulați flacoanele sparte. Luați măsuri adecvate de precauție la eliminarea flacoanelor. Se recomandă să utilizați un clește de desigilare a flacoanelor pentru deschiderea flacoanelor Conjugat sau Standard IFN- γ pentru a reduce la minimum riscul de leziuni provocate de capacul cu sigiliu metalic.

-
- Nu amestecați și nu utilizați stripuri de microplăci, Standard IFN- γ , Diluant verde sau conjugat concentrat 100x din kituri QFT SARS aparținând unor loturi diferite. Alți reactivi (soluția tampon de spălare concentrată 20x, soluția de substrat enzimatic și soluția de inhibitor enzimatic) pot fi interschimbați între truse cu condiția ca reactivii să nu aibă termenul de valabilitate expirat și detaliile lotului să fie înregistrate.
 - Eliminați reactivii neutilizați și probele biologice conform reglementărilor locale, naționale și federale.
 - Nu utilizați QFN SARS ELISA Kit după data de expirare.
 - Procedurile de laborator corecte trebuie urmate în permanență.
 - Asigurați-vă că echipamentele de laborator, precum spălătoarele și cititoarele de plăci au fost calibrate/validate pentru utilizare.

Depozitarea și manipularea reactivilor

Trebuie acordată atenție datelor de expirare și condițiilor de depozitare tipărite pe cutiile și etichetele tuturor componentelor. Nu utilizați componente expirate sau depozitate în mod incorect.

Stabilitatea în utilizare

- Păstrați kitul ELISA la o temperatură cuprinsă între 2 și 8 °C.
- Protejați întotdeauna soluția de substrat enzimatic de lumina solară directă.

Reactivii reconstituiți și neutilizați

- Pentru instrucțiuni despre modul de reconstituire a reactivilor, consultați „Procedură: Efectuarea testului ELISA”, pagina 18.
- Standardul din kit reconstituit poate fi păstrat cel mult 3 luni, dacă este păstrat la temperaturi cuprinse între 2 și 8 °C.

Notați data la care a fost reconstituit standardul din kit.

- Conjugatul concentrat 100X reconstituit trebuie păstrat în continuare la temperaturi cuprinse între 2 și 8 °C și utilizat în cel mult 3 luni.

Notați data la care a fost reconstituit conjugatul.

- Conjugatul în concentrație de lucru trebuie utilizat în cel mult 6 ore de la preparare.
- Soluția tampon de spălare în concentrație de lucru poate fi păstrată la temperatura camerei timp de cel mult 2 săptămâni.

Depozitarea și manipularea speci­menelor

Consultați *Instrucțiunile de utilizare ale tuburilor QuantiFERON SARS-CoV-2 (QFN SARS) Blood Collection Tube* (1124422) pentru detalii despre fluxul de lucru de recoltare a sângelui pentru testul QFN SARS.

Procedură: Efectuarea testului ELISA

Protocol: IFN- γ ELISA

Aspecte importante

- Consultați Conținutul kitului, pagina 9 și Materiale necesare, dar nefurnizate, pagina 11 pentru materialele necesare pentru a efectua testul ELISA.

Configurarea (timpul necesar pentru efectuarea testului)

Pentru a obține rezultate valide din testul QFN SARS, operatorul trebuie să efectueze sarcini specifice în intervale de timp stabilite. Înainte de utilizarea testului, se recomandă ca operatorul să planifice cu atenție fiecare etapă a testului pentru a acorda un timp adecvat pentru efectuarea fiecărei etape. Timpul necesar este estimat mai jos; durata testării probelor multiple grupate pe loturi este, de asemenea, indicată.

- Aproximativ 3 ore pentru o placă ELISA
- <1 oră de lucru
- Se adaugă 10-15 minute pentru fiecare placă suplimentară

Procedură

1. Toate probele de plasmă și toți reactivii, cu excepția conjugatului concentrat 100x, trebuie aduse la temperatura camerei ($22\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 5\text{ }^{\circ}\text{C}$) înainte de utilizare. Lăsați-le cel puțin 60 de minute pentru echilibrare.
2. Scoateți de pe suport stripurile de plăci ELISA care nu sunt necesare, ambalați-le la loc în punga de protecție și păstrați-le în frigider cât timp este necesar.
3. Alocați cel puțin 1 strip pentru standardele QFN SARS și stripuri suficiente pentru numărul de subiecți supuși testării (consultați Figura 2 pentru formatul de placă recomandat). După utilizare, păstrați suportul și capacul în vederea utilizării împreună cu stripurile rămase.

- 3a. Reconstituiți standardul IFN- γ cu volumul de apă deionizată sau distilată indicat pe eticheta flaconului. Amestecați ușor pentru a minimiza spumarea și a asigura dizolvarea completă a întregului conținut al flaconului. Prin reconstituirea standardului IFN- γ la volumul corect se va obține o soluție cu o concentrație de 8,0 UI/ml.
- 3b. Folosind standardul reconstituit, preparați o serie de diluție de 4 concentrații IFN- γ (consultați Figura 1).
- 3c. Trebuie generată o curbă standard cu următoarele concentrații de IFN- γ :
- S1 (Standard 1) conține 4,0 UI/ml
 - S2 (Standard 2) conține 1,0 UI/ml
 - S3 (Standard 3) conține 0,25 UI/ml
 - S4 (Standard 4) conține 0 UI/ml (numai Diluant verde [Green Diluent, GD])
- 3d. Standardele trebuie testate cel puțin în duplicat.
- 3e. Preparați diluții proaspete cu standard din trusă pentru fiecare sesiune de testare ELISA.

| Procedură | |
|-----------|---|
| A | Etichetați 4 tuburi: S1, S2, S3, S4 |
| B | Adăugați 150 μ l de DV în S1, S2, S3, S4 |
| C | Adăugați 150 μ l de standard din trusă în tubul S1 și amestecați bine |
| D | Transferați 50 μ l din tubul S1 în tubul S2 și amestecați bine |
| E | Transferați 50 μ l din tubul S2 în tubul S3 și amestecați bine |
| F | DV simplu servește ca standard zero (S4) |

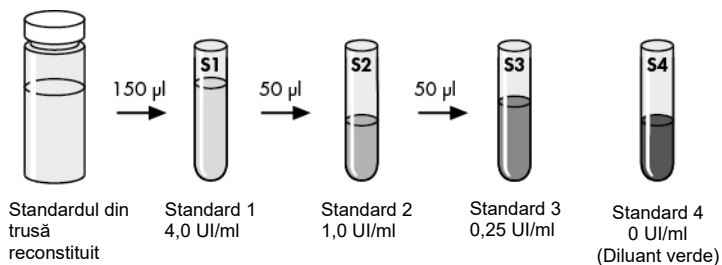


Figura 1. Prepararea seriei de diluție a curbei standard.

4. Reconstituiți conjugatul concentrat 100x liofilizat cu 0,3 ml de apă deionizată sau distilată. Amestecați ușor pentru a minimiza spumarea și a asigura dizolvarea completă a întregului conținut al flaconului.
 - 4a. Concentrația de lucru a conjugatului se obține prin diluarea cantității necesare de conjugat concentrat 100× reconstituit în Diluant verde (Tabelul 1).
 - 4b. Conjugatul în concentrație de lucru trebuie utilizat în cel mult 6 ore de la preparare.
 - 4c. Readuceți conjugatul concentrat 100× neutilizat la o temperatură între 2 și 8 °C imediat după utilizare.

Tabelul 1. Prepararea conjugatului (concentrație de lucru)

| Numărul de stripuri | Volumul conjugatului (100x concentrat) | Volumul de Diluant verde |
|---------------------|---|--------------------------|
| 2 | 10 µl | 1,0 ml |
| 3 | 15 µl | 1,5 ml |
| 4 | 20 µl | 2,0 ml |
| 5 | 25 µl | 2,5 ml |
| 6 | 30 µl | 3,0 ml |
| 7 | 35 µl | 3,5 ml |
| 8 | 40 µl | 4,0 ml |
| 9 | 45 µl | 4,5 ml |
| 10 | 50 µl | 5,0 ml |
| 11 | 55 µl | 5,5 ml |
| 12 | 60 µl | 6,0 ml |

5. Pentru probele de plasmă recoltate din tuburile de recoltare a sângelui și ulterior depozitate (refrigerate sau congelate), amestecați bine proba depozitată înainte de a o adăuga la godeul ELISA. Probele de plasmă pot fi păstrate în tuburi QFN SARS Blood Collection Tube centrifugate până la 28 de zile la 2-8 °C, sau probele de plasmă recoltate pot fi păstrate până la 28 de zile la 2-8 °C. Probele de plasmă recoltate pot fi, de asemenea, păstrate sub -20 °C (de preferință mai puțin de -70 °C) timp de până la 24 de luni.

Probele de plasmă pot fi încărcate/utilizate direct din tuburile de recoltare a sângelui centrifugate pentru măsura pe placa the QFN SARS ELISA.

Important: Dacă probele de plasmă trebuie transferate direct din tuburile QFN SARS Blood Collection Tube centrifugate, trebuie să evitați orice amestecare a plasmei. Aveți în permanență grijă să nu afectați materialul de pe suprafața gelului.

6. Adăugați 50 µl de conjugat în concentrație de lucru proaspăt preparat în fiecare godeu al plăcii ELISA.
7. Adăugați 50 µl de probă de plasmă pentru testare în godeurile corespunzătoare (consultați configurația de placă ELISA din Figura 2).
8. În cele din urmă, adăugați câte 50 µl din Standardele 1 până la 4 în godeurile corespunzătoare ale plăcii (consultați configurația recomandată de placă ELISA în Figura 2). Standardele trebuie testate cel puțin în duplicat.

| | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 | 11 | 12 |
|---|-------|-------|-------|-------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|
| A | 1 N | 3 N | 5 N | 7 N | 9 N | S1 | S1 | 13 N | 15 N | 17 N | 19 N | 21 N |
| B | 1 Ag1 | 3 Ag1 | 5 Ag1 | 7 Ag1 | 9 Ag1 | S2 | S2 | 13 Ag1 | 15 Ag1 | 17 Ag1 | 19 Ag1 | 21 Ag1 |
| C | 1 Ag2 | 3 Ag2 | 5 Ag2 | 7 Ag2 | 9 Ag2 | S3 | S3 | 13 Ag2 | 15 Ag2 | 17 Ag2 | 19 Ag2 | 21 Ag2 |
| D | 1 M | 3 M | 5 M | 7 M | 9 M | S4 | S4 | 13 M | 15 M | 17 M | 19 M | 21 M |
| E | 2 N | 4 N | 6 N | 8 N | 10 N | 11 N | 12 N | 14 N | 16 N | 18 N | 20 N | 22 N |
| F | 2 Ag1 | 4 Ag1 | 6 Ag1 | 8 Ag1 | 10 Ag1 | 11 Ag1 | 12 Ag1 | 14 Ag1 | 16 Ag1 | 18 Ag1 | 20 Ag1 | 22 Ag1 |
| G | 2 Ag2 | 4 Ag2 | 6 Ag2 | 8 Ag2 | 10 Ag2 | 11 Ag2 | 12 Ag2 | 14 Ag2 | 16 Ag2 | 18 Ag2 | 20 Ag2 | 22 Ag2 |
| H | 2 M | 4 M | 6 M | 8 M | 10 M | 11 M | 12 M | 14 M | 16 M | 18 M | 20 M | 22 M |

Figura 2. Configurație recomandată de placă ELISA. S1 (Standard 1), S2 (Standard 2), S3 (Standard 3), S4 (Standard 4). 1N (Proba 1. plasmă substanță de control Nil), 1 Ag1 (Proba 1. plasmă Ag1), 1 Ag2 (Proba 1. plasmă Ag2), 1M (Proba 1. plasmă Mitogen).

9. Acoperiți placa ELISA și omogenizați temeinic conjugatul și probele de plasmă/standardele folosind un agitator pentru microplăci timp de 1 minut la 500-1000 rot/min. Evitați stropirea.
10. Acoperiți placa ELISA și incubați la temperatura camerei (22 ± 5 °C) timp de 120 ± 5 minute. Placa ELISA nu trebuie expusă la lumină solară directă pe durata incubării. Abaterea de la intervalul de temperatură specificat poate duce la rezultate incorecte.
11. În timpul incubării plăcii ELISA, preparați soluția tampon de spălare în concentrație de lucru. Diluați o parte soluție tampon de spălare concentrată 20× cu 19 părți de apă deionizată sau distilată și omogenizați temeinic. A fost furnizată o cantitate suficientă de soluție tampon de spălare concentrată 20x pentru a prepara 2 litri de soluție tampon de spălare în concentrație de lucru.
12. Când incubarea plăcii ELISA este completă, spălați godeurile pentru plăci ELISA cu 400 μl de soluție tampon de spălare la concentrație de lucru. Efectuați etapa de spălare de cel puțin 6 ori. Este recomandat un spălător de plăci automat din motive de siguranță la manipularea probelor de plasmă.

Spălarea temeinică este foarte importantă pentru reușita testului. Asigurați-vă că fiecare godeu este umplut în întregime cu soluție tampon de spălare până în partea superioară a godeului pentru fiecare ciclu de spălare. Este recomandată o perioadă de înmuiere de cel puțin 5 secunde între cicluri.

În rezervorul pentru efluent trebuie adăugat dezinfectant standard de laborator, iar pentru decontaminarea materialelor potențial infecțioase trebuie urmate procedurile omologate.

13. Loviți ușor placa ELISA așezate cu fața în jos pe un prosop absorbant fără scame pentru a elimina soluția tampon de spălare reziduală. Adăugați 100 μl de Enzyme Substrate Solution în fiecare godeu al plăcii, acoperiți placa și omogenizați temeinic, folosind un agitator pentru microplăci timp de 1 minut la 500–1000 rot/min.

-
14. Acoperiți placa ELISA și incubați la temperatura camerei (22 ± 5 °C) timp de 30 de minute. Placa ELISA nu trebuie expusă la lumină solară directă pe durata incubării.
 15. După o incubare de 30 de minute, adăugați 50 μ l de soluție de inhibitor enzimatic în fiecare godeu al plăcii, în aceeași ordine în care a fost adăugat substratul și omogenizați temeinic la 500-1000 rot/min, folosind un agitator pentru microplăci.
 16. Măsurați Densitatea Optică (DO) a godeurilor plăcii ELISA în cel mult 5 minute de la stoparea reacției, utilizând un cititor de microplăci prevăzut cu un filtru de 450 nm și un filtru de referință între 620 și 650 nm. Valorile DO sunt utilizate pentru calcularea rezultatelor.

Rezultate (calculare)

Pentru analiza datelor brute și calcularea rezultatelor, poate fi folosit QFN SARS Analysis Software. Acesta este disponibil la pagina www.qiagen.com. Vă rugăm să vă asigurați că este utilizată cea mai nouă versiune a QFN SARS Analysis Software.

Software-ul efectuează o evaluare a controlului calității testului, generează o curbă standard și furnizează rezultatul testului pentru fiecare subiect, așa cum este detaliat în „Interpretarea rezultatelor”, pagina 28. Software-ul raportează toate concentrațiile mai mari de 10 UI/ml ca „>10”, deoarece astfel de valori depășesc intervalul liniar validat al ELISA.

Ca o alternativă la utilizarea QFN SARS Analysis Software, rezultatele pot fi obținute folosind metoda de mai jos.

Generarea curbei standard și a valorilor probelor

Dacă nu este utilizat QFN SARS Analysis Software

Determinarea curbei standard și a valorilor UI/ml ale probelor necesită un program de calcul tabelar, cum ar fi Microsoft® Excel®, dacă QFN SARS Analysis Software nu este utilizat.

Utilizarea unui program de calcul tabelar

1. Determinați media valorilor DO ale duplicatelor standardului din trusă de pe fiecare placă.
2. Construiți o curbă standard $\log_{(e)}-\log_{(e)}$ reprezentând grafic valoarea $\log_{(e)}$ a mediei DO (axa y) în raport cu valoarea $\log_{(e)}$ a concentrației de IFN- γ a standardelor în UI/ml (axa x), omițând standardul zero din aceste calcule. Calculați linia care corespunde cel mai bine curbei standard prin analiza de regresie.
3. Utilizați curba standard pentru determinarea concentrației de IFN- γ (UI/ml) pentru fiecare dintre probele de plasmă testate, utilizând valoarea DO a fiecărei probe.

4. Aceste calcule pot fi efectuate utilizând pachetele software disponibile împreună cu cititoarele de microplăci și un program de calcul tabelar sau un software statistic standard (ca de exemplu Microsoft Excel). Este recomandat ca aceste pachete să fie utilizate pentru a calcula analiza de regresie, coeficientul de variație (CV%) al standardelor și coeficientul de corelație (r) al curbei standard.

Calcularea rezultatelor probei

Dacă s-ar obține următoarele citiri pentru densitatea optică (DO) pentru standarde, calculele folosind $-\log_{(e)}$ – le-ar urma pe cele din Tabelul 2.

Tabelul 2. Curbă a soluției standard

| Standard | UI/ml | Valorile a și b ale DO | DO medie | CV% | Log _(e) UI/ml | Log _(e) mediu (DO) |
|------------|-------|------------------------|----------|--------------|--------------------------|-------------------------------|
| Standard 1 | 4 | 1,089, 1,136 | 1,113 | 3,0 | 1,386 | 0,107 |
| Standard 2 | 1 | 0,357, 0,395 | 0,376 | 7,1 | 0,000 | -0,978 |
| Standard 3 | 0,25 | 0,114, 0,136 | 0,125 | NU SE APLICĂ | -1,386 | -2,079 |
| Standard 4 | 0 | 0,034, 0,037 | 0,036 | NU SE APLICĂ | NU SE APLICĂ | NU SE APLICĂ |

Ecuția curbei este $y = 0,7885(X) - 0,9837$, unde „m” = 0,7885 și „c” = -0,9837. Aceste valori sunt utilizate în ecuația $X = (Y-c)/m$ pentru rezolvarea X. Pe baza curbei standard, coeficientul de corelație calculat (r) = 1.000. **NA:** Nu se aplică.

Validitatea testului este determinată folosind criteriile specificate în „Controlul calității testului”, pagina 26.

Curba standard (Tabelul 2) este utilizată pentru a converti răspunsurile DO antigen în unități internaționale (UI/ml).

Tabelul 3. Calcularea rezultatelor probei

| Antigen | Valoare DO | Valoare DO $\log_{(e)}$ | X | e^x (UI/ml) | Antigen-Nil (UI/ml) |
|---------|------------|----------------------------|--------|---------------|------------------------|
| Nil | 0,037 | -3,297 | -2,934 | 0,05 | – |
| Ag1 | 1,161 | 0,149 | 1,437 | 4,21 | 4,15 |
| Ag2 | 1,356 | 0,305 | 1,634 | 5,12 | 5,07 |
| Mitogen | 1,783 | 0,578 | 1,981 | 7,25 | 7,20 |

Valorile $\text{IFN-}\gamma$ (în UI/ml) pentru Ag1, Ag2 și Mitogen sunt corectate pentru fond scăzând valoarea UI/ml obținută pentru controlul Nil respectiv. Aceste valori corectate sunt utilizate pentru interpretarea rezultatelor testului.

Controlul calității testului

Acuratețea rezultatelor testului depinde de generarea unei curbe standard exacte. Din acest motiv, rezultatele obținute pe baza standardelor trebuie examinate înainte ca rezultatele probelor testate să poată fi interpretate.

Pentru ca testul ELISA să fie valid:

- Valoarea medie a DO pentru Standardul 1 trebuie să fie $\geq 0,600$.
- CV% pentru valorile DO duplicate pentru Standardul 1 și Standardul 2 trebuie să fie $\leq 15\%$.
- Valorile DO duplicate pentru Standardul 3 și Standardul 4 nu trebuie să varieze cu mai mult de 0,040 unități de densitate optică față de media lor.
- Coeficientul de corelație (r) calculat pe baza valorilor medii de absorbanță ale standardelor trebuie să fie $\geq 0,98$.
- Dacă criteriile de mai sus nu sunt îndeplinite, execuția testului este nevalidă și trebuie repetată.

- Valoarea medie a DO pentru Standardul zero (Diluantul verde) trebuie să fie $\leq 0,150$. Dacă valoarea medie a DO este $> 0,150$, trebuie analizată procedura de spălare a plăcilor.

QFN SARS Analysis Software calculează și raportează acești parametri de control al calității.

Fiecare laborator trebuie să determine tipurile adecvate de materiale de control și frecvența testării în conformitate cu organizațiile de acreditare locale, naționale, federale sau cu alte organizații aplicabile. Evaluarea externă a calității și procedurile alternative de validare trebuie luate în considerare.

Rețineți: Plasmele îmbogățite cu IFN- γ recombinant au demonstrat reduceri de până la 50 % ale concentrației atunci când sunt păstrate fie la 2-8 °C, fie la -20 °C. IFN- γ recombinant nu este recomandat pentru stabilirea standardelor de control în probele de plasmă.

Interpretarea rezultatelor

Rezultatele testului QFN SARS sunt interpretate pe baza următoarelor criterii (Tabelul 4).

Important: Testul QFN SARS trebuie utilizat împreună cu alte teste de laborator și evaluare epidemiologică/clinică pentru a evalua răspunsul imun al unei persoane la vaccinarea împotriva COVID-19.

Tabelul 4. Interpretarea rezultatelor testului QFN SARS

| Nil (UI/ml) | Antigen Ag1 minus Nil (UI/ml) | Antigen Ag2 minus Nil (UI/ml) | Mitogen minus Nil (UI/ml)* | Rezultat QFN SARS | Raport/Interpretare |
|--------------------|------------------------------------|------------------------------------|----------------------------|---------------------------|--|
| ≤ 8,0 | ≥ 0,15 și ≥ 25% din Nil | Orice valoare | Orice valoare | Reactiv | <i>Răspuns SARS-CoV-2 detectat</i> |
| | Orice valoare | ≥ 0,15 și ≥ 25% din Nil | | | |
| | < 0,15 sau ≥ 0,15 și < 25% din Nil | < 0,15 sau ≥ 0,15 și < 25% din Nil | ≥ 0,50 | Nereactiv | <i>Răspunsul SARS-CoV-2 NU a fost detectat</i> |
| | < 0,15 sau ≥ 0,15 și < 25% din Nil | < 0,15 sau ≥ 0,15 și < 25% din Nil | < 0,50 | Neconcludent [‡] | <i>Răspunsul SARS-CoV-2 și Mitogen nu pot fi detectate</i> |
| > 8,0 [§] | Orice valoare | | | | |

* De obicei, răspunsurile la controlul pozitiv cu Mitogen (și ocazional răspunsurile la Antigenul Ag) pot fi în afara intervalului cititorului de microplăci. Acest lucru nu influențează rezultatele testelor. Valorile > 10 UI/ml sunt raportate de software-ul QFN SARS ca > 10 UI/ml.

[‡] Consultați „Ghid de depanare”, pagina 51 pentru cauzele posibile.

[§] În cadrul studiilor clinice, mai puțin de 0,25 % dintre subiecți au înregistrat niveluri de IFN-γ > 8,0 UI/ml pentru valoarea Nil.

Limitări

Rezultatele testului QFN SARS trebuie interpretate împreună cu istoricul epidemiologic, starea curentă de sănătate și alte evaluări de diagnosticare ale fiecărui individ.

Persoanele cu valori Nil mai mari de 8 UI/ml sunt clasificate ca „Neconcludente” deoarece un răspuns cu 25 % mai mare la antigenii Ag poate fi în afara intervalului de măsurare a testului.

- Un rezultat nereactiv trebuie luat în considerare cu datele medicale și istorice ale individului, relevante pentru probabilitatea de răspuns imun la vaccinare, în special pentru persoanele cu funcție imună afectată.
- Testul QFN SARS trebuie utilizat împreună cu alte teste de laborator și evaluare epidemiologică/clinică pentru a evalua răspunsul imun al unei persoane la vaccinarea împotriva COVID-19.

Rezultatele nefiabile sau neconcludente se pot datora:

- Abaterilor de la procedura descrisă în Instrucțiunile de utilizare
- Transportului/manipulării incorect(e) a(l) specimenului de sânge
- Nivelurilor crescute de IFN- γ circulatorii sau prezența anticorpilor heterofili
- Depășirea timpilor validați pentru sânge de la extragerea specimenului de sânge până la incubare. Consultați *Instrucțiunile de utilizare ale tuburilor QFN SARS Blood Collection Tube* (1124422).

Caracteristicile de performanță ale testului

Performanță analitică

Pragul testului

Pragul testului QFN SARS a fost determinat folosind date de la douăzeci (20) de subiecți testați nereactiv la SARS-CoV-2 cu un test RT-PCR sau un test serologic și douăzeci (20) de donatori care au fost complet vaccinați (între 2-16 săptămâni după vaccinarea completă) cu un vaccin autorizat FDA EUA. Datele privind sensibilitatea și specificitatea împreună cu intervalele de încredere (II) bilaterale exacte de 95 % au fost analizate și au demonstrat că pragul optim al testului ELISA a fost de 0,15 UI/ml (consultați Tabelul 5).

Tabelul 5. Valori de prag QFN SARS (UI/ml) cu sensibilitatea și specificitatea corespunzătoare cu ÎI bilateral exact de 95 %

| Valoare de prag | Sensibilitate | | | Specificitate | | |
|-----------------|---------------|---------------------------|---------------------------|---------------|---------------------------|---------------------------|
| | Valoare | Limită inferioară ÎI 95 % | Limită superioară ÎI 95 % | Valoare | Limită inferioară ÎI 95 % | Limită superioară ÎI 95 % |
| 0,1 | 1,000 | 0,940 | 1,000 | 0,933 | 0,838 | 0,982 |
| 0,15 | 0,983 | 0,911 | 1,000 | 1,000 | 0,940 | 1,000 |
| 0,2 | 0,900 | 0,795 | 0,962 | 1,000 | 0,940 | 1,000 |
| 0,25 | 0,733 | 0,603 | 0,839 | 1,000 | 0,940 | 1,000 |
| 0,3 | 0,717 | 0,586 | 0,825 | 1,000 | 0,940 | 1,000 |
| 0,35 | 0,650 | 0,516 | 0,769 | 1,000 | 0,940 | 1,000 |
| 0,4 | 0,600 | 0,465 | 0,724 | 1,000 | 0,940 | 1,000 |
| 0,45 | 0,567 | 0,432 | 0,694 | 1,000 | 0,940 | 1,000 |
| 0,5 | 0,467 | 0,337 | 0,600 | 1,000 | 0,940 | 1,000 |
| 0,55 | 0,433 | 0,306 | 0,568 | 1,000 | 0,940 | 1,000 |
| 0,6 | 0,400 | 0,276 | 0,535 | 1,000 | 0,940 | 1,000 |
| 0,65 | 0,333 | 0,217 | 0,467 | 1,000 | 0,940 | 1,000 |
| 0,7 | 0,317 | 0,203 | 0,450 | 1,000 | 0,940 | 1,000 |
| 0,75 | 0,300 | 0,188 | 0,432 | 1,000 | 0,940 | 1,000 |
| 0,8 | 0,300 | 0,188 | 0,432 | 1,000 | 0,940 | 1,000 |

Liniaritate

Testul QFN SARS ELISA s-a dovedit liniar în condițiile poziționării aleatorii a 5 duplicate pentru 11 probe de plasmă cu concentrații de IFN- γ cunoscute pe placa ELISA. Linia regresiei liniare are o pantă de $1,002 \pm 0,011$ și un coeficient de corelație de 0,99 (Figura 3).

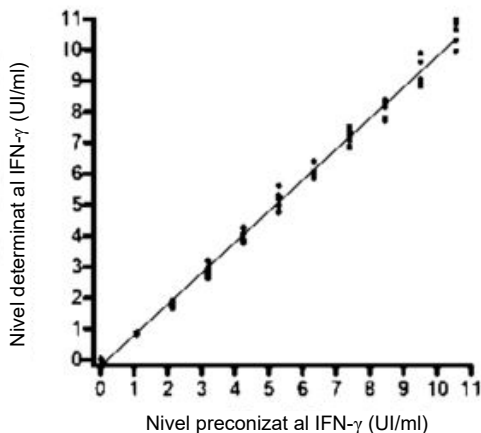


Figura 3. Ilustrație a analizei de regresie a studiului de liniaritate.

Reproductibilitate

A fost efectuat un studiu de reproductibilitate în mai multe laboratoare pentru a evalua performanța testului QFN SARS între laboratoare cu mai mulți operatori. Acest studiu a fost realizat la trei laboratoare din cadrul QIAGEN. Au fost înrolați în total trei (3) subiecți reactivi la SARS-CoV-2 și trei (3) subiecți de studiu nereactivi la SARS-CoV-2 (determinați prin testul RT-PCR sau testul serologic).

Sângele recoltat în patru (4) tuburi de recoltare a sângelui cu litiu-heparină a fost obținut de la fiecare subiect de studiu. Tuburile de recoltare a sângelui cu litiu-heparină au fost apoi transferate într-unul dintre laboratoarele de testare, unde sângele a fost împărțit în trei (3) seturi de tuburi QFN SARS Blood Collection Tube (QFN SARS Ag1, Ag2, Mitogen și Nil).

Câte un set de tuburi QFN SARS Blood Collection Tube (BCT) a fost transferat la fiecare dintre laboratoarele de testare și apoi testat în conformitate cu procedura de testare QFN SARS. Fiecare subiect a fost testat cu zece (10) duplicate (cinci (5) duplicate pentru Ag1 și cinci (5) duplicate pentru Ag2) în fiecare laborator. La fiecare laborator, câte un (1) operator a efectuat testul QFN SARS în mod independent. Niciun operator a cunoscut rezultatele obținute de ceilalți operatori, nici rezultatele testelor RT-PCR sau serologie ale subiectului de studiu.

Au fost generate câte 30 de rezultate în fiecare dintre cele trei (3) laboratoare de testare, rezultând în total 90 de puncte de date. Un rezumat al rezultatelor studiului de reproductibilitate este prezentat în Tabelul 6.

Tabelul 6. Rezumatul rezultatelor studiului de reproductibilitate – N = 30 de probe de la pacienți

| Laborator 1 – 1 operator | Laborator 2 – 1 operator | Laborator 3 – 1 operator |
|---------------------------------|---------------------------------|---------------------------------|
| 25/30 = 83 % | 30/30 = 100 % | 30/30 = 100 % |
| Acordul rezultatelor calitative | Acordul rezultatelor calitative | Acordul rezultatelor calitative |

Acordul total procentual între toate probele reactive și non-reactive față de rezultatele calitative preconizate (subiectul reactiv care returnează un rezultat reactiv și subiectul nereactiv care returnează un rezultat nereactiv pe baza rezultatului metodei de referință pentru subiect) a fost de 94,4 % (85/90) în toate cele trei (3) laboratoare.

Repetabilitate inter-loturi

A fost efectuat un studiu pentru a determina variabilitatea inter-loturi a tuburilor QFN SARS Blood Collection Tube. Au fost testați în total doi (2) subiecți reactivi la SARS-CoV-2 și trei (3) subiecți de studiu nereactivi la SARS-CoV-2 (determinați prin testul RT-PCR sau testul serologic). În acest studiu au fost incluse trei (3) loturi separate din fiecare dintre tuburile de recoltare a sângelui QFN SARS Ag1 și Ag2. Au fost testate cinci (5) duplicate per donator per lot de tuburi de recoltare a sângelui. Un rezumat al rezultatelor preciziei inter-loturi este prezentat în Tabelul 7.

Tabelul 7. Rezumatul rezultatelor studiului de precizie inter-loturi - acord procentual general pentru tuburile de recoltare a sângelui QFN SARS Ag1 și Ag2; N = 25

| QFN SARS BCT | Numărul de lot BCT | Număr de semnale calitative în acord/total semnale | Proporție | Limită de încredere inferioară | Limită de încredere superioară |
|--------------|--------------------|--|-----------|--------------------------------|--------------------------------|
| Ag1 | 1 | 25/25 | 100,00% | 86,28% | 100,00% |
| | 2 | 25/25 | 100,00% | 86,28% | 100,00% |
| | 3 | 25/25 | 100,00% | 86,28% | 100,00% |
| Ag2 | 1 | 25/25 | 100,00% | 86,28% | 100,00% |
| | 2 | 25/25 | 100,00% | 86,28% | 100,00% |
| | 3 | 25/25 | 100,00% | 86,28% | 100,00% |

Acordul total procentual între toate probele reactive și non-reactive față de rezultatele preconizate (subiectul reactiv care returnează un rezultat reactiv și subiectul nereactiv care returnează un rezultat nereactiv pe baza rezultatului metodei de referință pentru subiect) a fost de 100 % pe toate cele trei (3) loturi de tuburi de recoltare a sângelui QFN SARS Ag1 și Ag2.

Limită de blanc (LoB)

Limita de blanc (Limit of Blank, LoB) a fost evaluată pentru testul QFN SARS. Două (2) duplicate din câte paisprezece (14) probe individuale de plasmă umană normală (ca blancuri) au fost testate cu două (2) loturi de QFN SARS ELISA de către trei (3) operatori în trei (3) zile de testare, un (1) operator pe zi de testare pentru un total de 84 de duplicate din fiecare lot de kit ELISA.

Valorile LoB (UI/ml) pentru cele două (2) loturi de kituri ELISA au fost calculate separat, după cum se arată în Tabelul 8.

Tabelul 8. Valori LoB (UI/ml) pentru cele două (2) loturi de QFN SARS ELISA Kit

| QFN SARS ELISA Kit | LoB estimat (UI/ml) |
|---------------------------|----------------------------|
| Kit 1 | 0,030 |
| Kit 2 | 0,040 |

Valoarea LoB mai mare, de 0,040 UI/ml, dintre cele două loturi de QFN SARS ELISA Kit, a fost raportată ca valoare finală LoB.

Limită de detecție (LoD)

Limita de detecție (Limit of Detection, LoD) a fost evaluată pentru testul QFN SARS. O probă de plasmă umană a fost generată prin combinarea a paisprezece (14) probe individuale de plasmă. Fiecare dintre cei trei (3) operatori a pregătit câte un stoc standard de referință IFN- γ la 1,0 UI/ml diluat în soluție tampon. S-a realizat o serie de diluții de opt (8) concentrații în plasmă. Studiul a fost realizat pe parcursul a trei (3) zile, de către trei (3) operatori alternativi folosind două (2) loturi de QFN SARS ELISA Kit. Pentru fiecare zi de testare au fost testate câte cinci (5) duplicate din fiecare concentrație din fiecare set de serii de diluții seriale pentru un total de 45 de duplicate pentru fiecare diluție de concentrație IFN- γ pentru fiecare lot de QFN SARS ELISA Kit.

Valoarea LoD pentru fiecare dintre loturile de QFN SARS ELISA Kit testate a fost calculată separat, așa cum se arată în Tabelul 9. LoD a fost estimat folosind un model de regresie de tip probit. LoD s-a bazat pe concentrația estimată (UI/ml) care a generat o probabilitate estimată de 95 % de a obține o rată de succes mai mare de 0,04 UI/ml (determinată prin LoB).

Tabelul 9. Valori LoD (UI/ml) estimate pentru cele două (2) loturi de QFN SARS ELISA Kit

| QFN SARS ELISA Kit | Probabilitate | Estimarea concentrației (UI/ml) | Limită de încredere 95 % inferioară pentru estimare | Limită de încredere 95 % superioară pentru estimare |
|---------------------------|----------------------|--|--|--|
| Kit 1 | 0,95 | 0,063 | 0,060 | 0,067 |
| Kit2 | 0,95 | 0,065 | 0,060 | 0,073 |

Valoarea LoD mai mare calculată dintre cele două loturi de QFN SARS ELISA Kit, de 0,065 UI/ml, a fost raportată ca valoare finală LoD.

Substanțe de interferență

A fost efectuat un studiu pentru a determina efectele substanțelor de interferență potențiale asupra performanței detecției QFN SARS ELISA a IFN- γ . Substanțele interferente incluse în această testare au fost: trigliceride (totale), hemoglobină, proteine (ser total), bilirubină (conjugată), bilirubină (neconjugată), abacavir sulfat, ciclosporină și prednisolon. Cinci (5) probe de plasmă cu concentrații cunoscute de IFN- γ au fost preparate folosind diferite concentrații ale substanțelor interferente. Nivelul de IFN- γ din proba de bază a fost preparat anterior cu o cantitate predeterminată de IFN- γ prezent (aproximativ 0,21, 0,45 și 1,4 UI/ml). Această probă a fost apoi folosită pentru a pregăti probele de substanțe interferente. Au fost testate cinci niveluri diferite de concentrații ale substanțelor interferente, care s-au bazat pe intervale de referință, valori patologice, intervale terapeutice și intervale toxice sau conform recomandărilor furnizorului sau nivelurilor clinice generale. Au fost testate șase (6) duplicate pentru fiecare nivel de concentrație al probei de substanțe interferente.

Pentru fiecare concentrație de probă a fost efectuat un test T, comparând diferența în log10 mediu (UI/ml) a nivelului de interferență ridicat (10) în comparație cu substanța de control (adică nivelul fără substanțe interferente). În tabel sunt raportate diferența estimată în răspunsul mediu, împreună cu limitele corespunzătoare de încredere 95 % bilaterale și valoarea p.

Tabelul 10. Log₁₀ UI/ml: Tabel sumar al testului T pentru diferențele dintre valorile medii între nivelul de substanță de control și nivelul de substanță interferentă ridicat pentru fiecare nivel de concentrație a substanței interferente și de IFN-γ

| Concentrație | Nivel de interferență | Concentrația probei (UI/ml) | Diferență între medii | Limită inferioară Î 95 % | Limită superioară Î 95 % | Valoare P |
|------------------------|-----------------------|-----------------------------|-----------------------|--------------------------|--------------------------|-----------|
| Trigliceride | Ridicat | 1,4 | 0,053 | -0,004 | 0,110 | 0,063 |
| | | 0,45 | 0,039 | -0,021 | 0,058 | <0,001 |
| | | 0,21 | 0,034 | -0,002 | 0,071 | 0,061 |
| Hemoglobină | Ridicat | 1,4 | -0,001 | -0,042 | 0,040 | 0,967 |
| | | 0,45 | 0,016 | -0,007 | 0,040 | 0,152 |
| | | 0,21 | 0,014 | -0,030 | 0,059 | 0,489 |
| Proteină | Ridicat | 1,4 | -0,030 | -0,071 | 0,011 | 0,136 |
| | | 0,45 | 0,000 | -0,046 | 0,046 | 0,992 |
| | | 0,21 | -0,045 | -0,103 | 0,012 | 0,109 |
| Bilirubină conjugată | Ridicat | 1,4 | 0,001 | -0,046 | 0,048 | 0,961 |
| | | 0,45 | 0,012 | -0,043 | 0,067 | 0,639 |
| | | 0,21 | 0,015 | -0,044 | 0,074 | 0,586 |
| Bilirubină neconjugată | Ridicat | 1,4 | 0,015 | -0,011 | 0,042 | 0,231 |
| | | 0,45 | 0,015 | -0,023 | 0,052 | 0,411 |
| | | 0,21 | 0,012 | -0,033 | 0,057 | 0,566 |
| Abacavir | Ridicat | 1,4 | 0,013 | -0,015 | 0,040 | 0,322 |
| | | 0,45 | 0,015 | -0,014 | 0,044 | 0,283 |
| | | 0,21 | 0,008 | -0,034 | 0,050 | 0,677 |

Tabel continuat pe pagina următoare

Continuare tabel de la pagina anterioară

Tabelul 10. Log₁₀ UI/ml: Tabel sumar al testului T pentru diferențele dintre valorile medii între nivelul de substanță de control și nivelul de substanță interferentă ridicat pentru fiecare nivel de concentrație a substanței interferente și de IFN- γ

| Concentrație | Nivel de interferență | Concentrația probei (UI/ml) | Diferență între medii | Limită inferioară Î 95 % | Limită superioară Î 95 % | Valoare P |
|--------------|-----------------------|-----------------------------|-----------------------|--------------------------|--------------------------|-----------|
| Ciclosporină | Ridicat | 1,4 | 0,002 | -0,019 | 0,024 | 0,816 |
| | | 0,45 | 0,007 | -0,030 | 0,043 | 0,682 |
| | | 0,21 | 0,015 | -0,007 | 0,038 | 0,155 |
| Prednisolon | Ridicat | 1,4 | 0,007 | -0,016 | 0,030 | 0,518 |
| | | 0,45 | -0,001 | -0,034 | 0,033 | 0,964 |
| | | 0,21 | 0,021 | -0,025 | 0,068 | 0,334 |

Rezultatele nu au arătat diferențe semnificative statistic între cel mai înalt nivel de interferență testat și substanța de control (nivel fără substanțe interferente), cu excepția nivelului de concentrație al trigliceridelor 0,45 UI/ml. S-a determinat că diferența dintre medii pentru această valoare se află în intervalul ± 2 abateri standard ale măsurătorii nivelului mediu de substanță de control, demonstrând că diferența observată se încadrează în variabilitatea preconizată a testului și că nu este de așteptat ca nivelurile relevante din punct de vedere clinic ale trigliceridelor să interfereze cu QFN SARS ELISA.

Performanță clinică

Performanța clinică a testului QFN SARS a fost evaluată într-un studiu prospectiv, observațional, realizat din iunie până în octombrie 2021, folosind subiecți fără antecedente de infecție cu SARS-CoV-2 care au beneficiat de vaccinare împotriva COVID-19 cu vaccinuri care vizează proteina S virală a SARS-CoV-2, precum și cei fără antecedente de infecție cu SARS-CoV-2 care nu au beneficiat de vaccinare împotriva COVID-19.

Subiecții care au și-au dat acordul au fost evaluați în funcție de criteriile de includere și excludere în studiu și numai subiecții care au îndeplinit toate criteriile de includere, dar niciunul dintre criteriile de excludere nu au fost înregistrați și au fost supuși recoltării de sânge pentru QFN SARS.

Mai jos este prezentat un sumar al populației înregistrate:

- Grupul 1: Subiecții incluși fără antecedente de infecție naturală cu SARS-CoV-2 nu făcuseră vaccinul împotriva COVID-19 la momentul recoltării sângelui pentru QFN SARS, nu au fost niciodată testați pozitiv pentru infecția cu SARS-CoV-2, au raportat un rezultat serologic nereactiv al testării și nu au prezentat semne sau simptome de COVID-19 într-o perioadă de 4 săptămâni înainte de înregistrare.
- Grupul 2: Subiecții incluși fără antecedente de infecție cu SARS-CoV-2 beneficiaseră de vaccinare împotriva COVID-19 care viza proteina S a SARS-CoV-2 în momentul recoltării sângelui pentru QFN SARS și nu au fost niciodată testați pozitiv pentru infecția cu SARS-CoV-2.
- Niciunul dintre subiecți nu a suferit vreun transplant (de organe solide sau celule) și/sau vreun tratament pentru cancer la momentul participării la studiu.

În total, 218 subiecți au fost înregistrați în Grupul 1, în timp ce 171 de subiecți au fost înregistrați în Grupul 2. După recoltarea sângelui QFN SARS, patru subiecți din Grupul 1 s-au dovedit a nu fi eligibili din cauza unui rezultat serologic reactiv al testării, obținut folosind o probă recoltată la aceeași vizită în care a avut loc recoltarea de sânge pentru QFN SARS și au fost ulterior excluși din analiză.

Au fost recoltate probe, tuburile QFN SARS Blood Collection Tube au fost procesate și plasma a fost depozitată la ≤ -20 °C până când a fost pregătită pentru testare cu QFN SARS ELISA. Toate testările cu plăci QFN SARS ELISA au fost valide și nu s-au obținut rezultate neconcludente, rezultând 214 și 171 de probe care au putut fi evaluate din Grupul 1 și, respectiv, Grupul 2.

Date demografice

Numărul de probe recoltate în fiecare țară și procentul din total pentru fiecare grup de studiu sunt prezentate în Tabelul 11.

Tabelul 11. Sumarul țărilor de recoltare a probelor

| Țara de recoltare a probelor | Grupul 1 | | Grupul 2 | |
|------------------------------|----------|---------|----------|--------|
| | N | % | N | % |
| Țările de Jos | 214 | 100,00% | 153 | 89,47% |
| SUA | 0 | 0,00% | 18 | 10,53% |

Un sumar privind vârsta subiecților, inclusiv vârsta medie, mediană, minimă și maximă și abaterea standard (Standard Deviation, SD) de vârstă este prezentat în Tabelul 12.

Tabelul 12. Sumar privind vârsta subiecților (ani)

| N | Medie | Median | SD | Minim | Maxim |
|-----|-------|--------|--------|-------|-------|
| 385 | 40,47 | 37,00 | 14,168 | 18,00 | 80,00 |

Un sumar privind sexul subiecților este prezentat în Tabelul 13.

Tabelul 13. Sumar privind sexul subiecților

| Sex | N | % |
|--------|-----|--------|
| Femeie | 234 | 60,78% |
| Bărbat | 151 | 39,22% |

Specificitate

Acordul clinic care compară rezultatele QFN SARS cu rezultatele metodei de referință este prezentat în Tabelul 14.

Tabelul 14. Acordul clinic: Rezultatul QFN SARS vs. Metoda de referință

| | | Rezultatul metodei de referință | | |
|-------------------|-----------|---------------------------------|-----------------------------|-------|
| | | Grupul 1 (- vax, -infecție) | Grupul 2 (+ vax, -infecție) | Total |
| Rezultat QFN SARS | Nereactiv | 199 | 34 | 233 |
| | Reactiv | 15 | 137 | 152 |
| Total | | 214 | 171 | 385 |

Pentru subiecții nevaccinați (Grupul 1), 199 din 214 au fost testați nereactiv folosind QFN SARS, în timp ce restul de 15 au fost testați reactiv. Pentru subiecții vaccinați (Grupul 2), 137 din 171 au fost testați reactiv folosind QFN SARS, în timp ce restul de 34 au fost testați nereactiv. Niciuna dintre cele 15 și 34 de probe discordante din Grupul 1 și, respectiv, 2, nu a beneficiat de testare suplimentară cu o metodă discordantă.

Acordul procentual negativ (Negative Percent Agreement, NPA) (specificitatea) a fost calculat pentru subiecții nevaccinați (Grupul 1), împreună cu intervalul de încredere (ÎI) 95 % bilateral exact și este prezentat în Tabelul 15.

Tabelul 15. Acord procentual negativ (specificitate)

| Nr. grup | NPA (specificitate) | IÎ 95% |
|-------------------------------|----------------------------|---------------|
| Grupul 1 (-vax, -infecție) | 92,99% (199/214) | 88,70-96,02 % |

Sensibilitate

Acordul procentual pozitiv (Positive Percent Agreement, PPA) (sensibilitatea) a fost calculat pentru subiecții vaccinați (Grupul 2), împreună cu IÎ 95 % bilateral exact și este prezentat în Tabelul 16.

Tabelul 16. Acord procentual pozitiv (sensibilitate)

| Nr. grup | PPA (sensibilitate) | IÎ 95% |
|-------------------------------|----------------------------|---------------|
| Grupul 2 (+vax, -infecție) | 80,12% (137/171) | 73,34-85,82% |

Acord procentual pozitiv în funcție de vârstă

Pentru subiecții vaccinați (Grupul 2), acordul procentual pozitiv a fost stratificat în funcție de vârstă < 60 și ≥ 60 de ani și este prezentat în Tabelul 17.

Tabelul 17. Acord procentual pozitiv după vârstă < 60 și ≥ 60 de ani

| Interval de vârstă (ani) | PPA (sensibilitate) | IÎ 95% |
|---------------------------------|----------------------------|---------------|
| < 60 | 85,33% (128/150) | 78,78-90,64% |
| ≥ 60 | 42,86% (9/21) | 21,82-65,98% |

Acord procentual pozitiv în funcție de vaccinul împotriva COVID-19

Pentru subiecții vaccinați (Grupul 2), acordul procentual pozitiv a fost stratificat în funcție de vaccinul împotriva COVID-19 administrat și este prezentat în Tabelul 18.

Tabelul 18. Acord procentual pozitiv în funcție de vaccinul împotriva COVID-19

| Vaccin | PPA (sensibilitate) | IÎ 95% |
|--------------------------------|---------------------|--------------|
| Astra Zeneca | 62,50% (5/8) | 24,49-91,48% |
| Janssen (Johnson & Johnson) | 86,67% (13/15) | 59,54-98,34% |
| Moderna | 77,27% (17/22) | 54,63-92,18% |
| Pfizer - BioNTech | 80,95% (102/126) | 73,00-87,40% |

Factori asociați cu rezultatele nereactive la subiecții vaccinați

Pentru a determina dacă înaintarea în vârstă, timpul de la finalizarea vaccinării împotriva COVID-19, vaccinul administrat și sexul se asociază cu rezultate nereactive la subiecții vaccinați (Grupul 2), a fost efectuată o analiză de regresie logistică univariată. Asocierea dintre fiecare factor și rezultatele nereactive a fost calculată în termeni de coeficient de probabilitate (CP), iar rezultatele sunt prezentate în Tabelul 19.

Tabelul 19. Asocierea dintre factori și rezultatele nereactive la subiecții vaccinați

| Factor | CP (îl 95 %) | Valoare p | |
|--|--|-------------------|-------|
| Vârstă (ani) | 1,08 (1,05-1,12) | < 0,001 | |
| Timp de la vaccinare până la recoltarea sângelui QFN SARS (zile) | 1,02 (1,01-1,03) | < 0,001 | |
| Vaccin | Pfizer – BioNTech | 1 | – |
| | Astra Zeneca | 2,55 (0,57-11,42) | 0,221 |
| | Janssen (Johnson & Johnson) | 0,65 (0,14-3,09) | 0,592 |
| | Moderna | 1,25 (0,42-3,72) | 0,689 |
| Sex | Femeie | 1 | – |
| | Bărbat | 1,25 (0,59-2,65) | 0,565 |

Singurii factori asociați semnificativ cu rezultatele nereactive la subiecții vaccinați au fost vârsta și timpul de la vaccinare.

Deoarece studiul a fost realizat în țări în care vaccinurile împotriva COVID-19 au fost puse mai întâi la dispoziție persoanelor în vârstă, vârsta se poate să fi influențat asocierea dintre timpul de la vaccinare și rezultatele nereactive. Tabelul 20 prezintă analiza de regresie cu vârsta drept covariabilă.

Tabelul 20. Asocierea dintre factori și rezultatele nereactive controlate pentru vârstă

| Factor | CP (îl 95 %) | Valoare p |
|--|------------------|-----------|
| Vârstă (ani) | 1,07 (1,03-1,11) | < 0,001 |
| Timp de la vaccinare până la recoltarea sângelui QFN SARS (zile) | 1,01 (1,00-1,02) | 0,214 |

Când vârsta este controlată, asocierea dintre timpul de la vaccinare și rezultatele nereactive nu mai este semnificativă, totuși vârsta a rămas semnificativ asociată.

Referințe

1. Goletti D., Petrone L, Manissero D, Bertoletti A, Rao S, Ndunda N, et al. The potential clinical utility of measuring SARS-CoV-2-specific T-cell responses. Clin Microbiol Infect [Internet]. 2021 Jul [cited 2021 Jul 13];0(0).Available from: <http://www.clinicalmicrobiologyandinfection.com/article/S1198743X21003785/fulltext>
2. Petrone L., Petruccioli E, Vanini V, Cuzzi G, Najafi Fard S, Alonzi T, et al. A whole blood test to measure SARS-CoV-2-specific response in COVID-19 patients. Clin Microbiol Infect. 2021
3. Petrone L., Petruccioli E, Vanini V, Cuzzi G, Gualano G, Vittozzi P, et al. Coinfection of tuberculosis and COVID-19 limits the ability to in vitro respond to SARS-CoV-2. Int J Infect Dis. 2021
4. Shrotri M., van Schalkwyk MCI, Post N, Eddy D, Huntley C, Leeman D, et al. T cell response to SARS-Cov-2 infection in humans: A systematic review. PLoS ONE. 2021
5. Alessandra D'Abamo, Serena Vita, Gaetano Maffongelli, Andrea Mariano , Chiara Agrati , Concetta Castilletti ,Delia Goletti, Giuseppe Ippolito, Emanuele Nicastrì SC-19 CIT. Prolonged and severe SARS-CoV-2 infection inpatients under B-cell-depleting drug successfully treated: A tailored approach. Int J Infect Dis. 2021;(107):247–50
6. Soresina A, Moratto D, Chiarini M, Paolillo C, Baresi G, Focà E, et al. Two X-linked agammaglobulinemia patients develop pneumonia as COVID-19 manifestation but recover. Pediatr Allergy Immunol. 2020
7. Quinti I, Lougaris V, Milito C, Cinetto F, Pecoraro A, Mezzaroma I, et al. A possible role for B cells in COVID-19? Lesson from patients with agammaglobulinemia. J Allergy Clin Immunol. 2020

8. Geers D, Shamier MC, Bogers S, den Hartog G, Gommers L, Nieuwkoop NN, et al. SARS-CoV-2 variants of concern partially escape humoral but not T-cell responses in COVID-19 convalescent donors and vaccinees. *Sci Immunol* [Internet]. 2021 May 1 [cited 2021 Jun 30];6(59). Available from: <http://immunology.sciencemag.org/>
9. Alter G, Yu J, Liu J, Chandrashekar A, Borducchi EN, Tostanoski LH, McMahan K, Jacob-Dolan C, Martinez DR, Chang A, Anioke T, Lifton M, Nkolola J, Stephenson KE, Atyeo C, Shin S, Fields P, Kaplan I, Robins H, Amanat F, Krammer F, Baric RS, Le Gars M, Sado BD. Immunogenicity of Ad26.COV2.S vaccine against SARS-CoV-2 variants in humans. *Nature*. 2021
10. Dan JM, Mateus J, Kato Y, Hastie KM, Yu ED, Faliti CE, et al. Immunological memory to SARS-CoV-2 assessed for up to 8 months after infection. *Science* (80-) [Internet]. 2021 Feb 5 [cited 2021 Jun 30];371(6529). Available from: <https://doi.org/10.1126/science.abf4063>
11. Chavarot N, Ouedrani A, Marion O, Leruez-Ville M, Villain E, Baaziz M, et al. Poor Anti-SARS-CoV-2 Humoral and T-cell Responses After 2 Injections of mRNA Vaccine in Kidney Transplant Recipients Treated with Belatacept. *Transplantation* [Internet]. 2021 Apr 8 [cited 2021 Jul 1];2. Available from: https://journals.lww.com/transplantjournal/Fulltext/9000/Poor_Anti_SARS_CoV_2_Humoral_and_T_cell_Responses.95281.aspx
12. Sekine T, Perez-Potti A, Rivera-Ballesteros O, Strålin K, Gorin JB, Olsson A, et al. Robust T Cell Immunity in Convalescent Individuals with Asymptomatic or Mild COVID-19. *Cell*. 2020
13. Alberto M, Borobia, Antonio J Carcas, Mayte Pérez-Olmeda, Luis Castaño, María Jesús Bertran, Javier García-Pérez, Magdalena Campins, Antonio Portolés, María González-Pérez, María Teresa García Morales, Eunáte Arana-Arri, Marta Aldea, Francisco Díez-Fuerte CSG. Immunogenicity and reactogenicity of BNT162b2 booster in ChAdOx1-S-

-
- primed participants (CombiVacS): a multicentre, open-label, randomised, controlled, phase 2 trial. *Lancet*. 2021
14. Mónica Martínez-Gallo, Juliana Esperalba-Esquerria, Ricardo Pujol-Borrell, Víctor Sandá, Iria Arrese-Muñoz, Candela Fernández Naval, Andrés Antón Pagarolas, Victoria Cardona, Moisés Labrador-Horrillo, Tomás Pumarola-Suñé MH-G. T-cell responses as a correlate of COVID-19 vaccination. A pilot study in Health Care Workers
 15. Van Praet JT, Vandecasteele S, De Roo A, De Vriese AS, Reynders M. Humoral and cellular immunogenicity of the BNT162b2 mRNA Covid-19 Vaccine in nursing home residents. *Clin Infect Dis*. 2021
 16. Pedersen RM, Tornby DS, Bistrup C, Johansen IS, Andersen TE JU. Negative SARS-CoV-2 antibodies, T cell response and virus neutralization following full vaccination in a renal transplant recipient: a call for vigilance. *Clin Microbiol Infect*. 2021
 17. Grifoni A, Weiskopf D, Ramirez SI, Mateus J, Dan JM, Moderbacher CR, et al. Targets of T Cell Responses to SARS-CoV-2 Coronavirus in Humans with COVID-19 Disease and Unexposed Individuals. *Cell*. 2020
 18. Rydzynski Moderbacher C, Ramirez SI, Dan JM, Grifoni A, Hastie KM, Weiskopf D, et al. Antigen-Specific Adaptive Immunity to SARS-CoV-2 in Acute COVID-19 and Associations with Age and Disease Severity. *Cell*. 2020
 19. Tan AT, Linster M, Tan CW, Le Bert N, Chia WN, Kunasegaran K, et al. Early induction of functional SARS-CoV-2-specific T cells associates with rapid viral clearance and mild disease in COVID-19 patients. *Cell Rep*. 2021
 20. Aiello A, Najafi Fard S, Petruccioli E, Petrone L, Vanini V, Farroni C, et al. Spike is the most recognized antigen in the whole-blood platform in both acute and convalescent COVID-19 patients. *Int J Infect Dis*. 2021

-
21. Soumya Jaganathan, Francis Stieber, Sonia N. Rao, Vladyslav Nikolayevskyy, Nadia Allen, Jeff Boyle JH. Preliminary Evaluation of QuantiFERON SARS-CoV-2 and QIArearch Anti-SARS-CoV-2 Total Test in Recently Vaccinated Individuals. 2021
 22. Zheng M, Gao Y, Wang G, Song G, Liu S, Sun D, et al. Functional exhaustion of antiviral lymphocytes in COVID-19 patients. *Cellular and Molecular Immunology*. 2020
 23. Aid M, Busman-Sahay K, Vidal SJ, Maliga Z, Bondoc S, Starke C, et al. Vascular Disease and Thrombosis in SARS-CoV-2-Infected Rhesus Macaques. *Cell*. 2020
 24. Kuri-Cervantes L, Pampena MB, Meng W, Rosenfeld AM, Ittner CAG, Weisman AR, et al. Comprehensive mapping of immune perturbations associated with severe COVID-19. *Sci Immunol*. 2020
 25. Lucas C, Wong P, Klein J, Castro TBR, Silva J, Sundaram M, et al. Longitudinal analyses reveal immunological misfiring in severe COVID-19. *Nature*. 2020
 26. Del Valle DM, Kim-Schulze S, Huang HH, Beckmann ND, Nirenberg S, Wang B, et al. An inflammatory cytokine signature predicts COVID-19 severity and survival. *Nat Med*. 2020
 27. Peng Y, Mentzer AJ, Liu G, Yao X, Yin Z, Dong D, et al. Broad and strong memory CD4+ and CD8+ T cells induced by SARS-CoV-2 in UK convalescent individuals following COVID-19. *Nat Immunol*. 2020
 28. Sattler A, Angermair S, Stockmann H, Heim KM, Khadzhynov D, Treskatsch S, et al. SARS-CoV-2-specific T cell responses and correlations with COVID-19 patient predisposition. *J Clin Invest*. 2020
 29. Mathew D, Giles JR, Baxter AE, Greenplate AR, Wu JE, Alanio C, et al. Deep immune profiling of COVID-19 patients reveals patient heterogeneity and distinct immunotypes with implications for therapeutic interventions. *bioRxiv Prepr Serv Biol*. 2020

-
30. Chen Z, John Wherry E. T cell responses in patients with COVID-19. *Nat Rev Immunol*. 2020
 31. Folegatti PM, Ewer KJ, Aley PK, Angus B, Becker S, Belij-Rammerstorfer S, et al. Safety and immunogenicity of the ChAdOx1 nCoV-19 vaccine against SARS-CoV-2: a preliminary report of a phase 1/2, single-blind, randomised controlled trial. *Lancet*. 2020
 32. Sahin U, Muik A, Derhovanessian E, Vogler I, Kranz LM, Vormehr M, et al. COVID-19 vaccine BNT162b1 elicits human antibody and TH1 T cell responses. *Nature*. 2020
 33. Ryu MR, Park MS, Cho EH, Jung CW, Kim K, Kim SJ, et al. Comparative evaluation of quantiFERON-TB gold in-tube and quantiFERON-TB gold plus in diagnosis of latent tuberculosis infection in immunocompromised patients. *J Clin Microbiol* [Internet]. 2018 Nov 1 [cited 2021 Jul 1];56(11). Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30135226/>
 34. Petruccioli E, Vanini V, Chiacchio T, Cuzzi G, Cirillo DM, Palmieri F, et al. Analytical evaluation of QuantiFERON- Plus and QuantiFERON- Gold In-tube assays in subjects with or without tuberculosis. *Tuberculosis*. 2017

Ghid de depanare

Acest ghid de depanare poate fi util în rezolvarea oricăror probleme care pot apărea. Pentru informații suplimentare, a se vedea și pagina „Întrebări frecvente” din cadrul Centrului nostru pentru Asistență Tehnică: www.qiagen.com/FAQ/FAQList.aspx. Cercetătorii din cadrul Serviciilor tehnice QIAGEN vă stau întotdeauna la dispoziție pentru a răspunde la orice întrebări pe care le aveți despre informațiile și/sau protocoalele din acest manual sau probă, precum și despre tehnologiile de prelevare și testare (pentru datele de contact, vizitați www.qiagen.com).

Comentarii și sugestii

Remediarea problemelor survenite la trusa ELISA

Colorare nespecifică

- | | |
|---|---|
| a) Spălare insuficientă a plăcii | Spălați placa de cel puțin 6 ori cu 400 µl de soluție tampon de spălare pentru fiecare godeu. Pot fi necesare mai mult de 6 cicluri de spălare, în funcție de spălătorul utilizat. Este necesară o perioadă de înmuiere de cel puțin 5 secunde între cicluri. |
| b) Contaminare încrucișată a godeurilor ELISA | Aveți grijă când pipetați sau amestecați proba pentru a reduce riscul la minimum. |
| c) Trusa/componentele a(u) expirat | Asigurați-vă că utilizați kitul înaintea datei de expirare. Asigurați-vă că standardul și conjugatul concentrat 100X reconstituite sunt utilizate în cel mult trei luni de la data reconstituirii. |
| d) Soluția de substrat enzimatic este contaminată | Eliminați substratul dacă acesta se colorează în albastru. Asigurați-vă că utilizați rezervoare curate pentru reactivi. |
| e) Amestecarea plasmei în tuburile QFN SARS Blood Collection Tube înaintea recoltării | După centrifugare, evitați sub orice formă pipetarea prin aspirarea și eliberarea înapoi și repetați sau amestecarea plasmei înainte de recoltare. Aveți în permanență grijă să nu afectați materialul de pe suprafața gelului. |

Comentarii și sugestii

Valori scăzute ale densității optice a standardelor

- | | |
|--|--|
| a) Eroare la diluarea standardului | Asigurați-vă că diluțiile standardului din kit sunt preparate corect, conform acestor instrucțiuni de utilizare. |
| b) Eroare la pipetare | Asigurați-vă că pipetele sunt calibrate și utilizate conform instrucțiunilor producătorului. |
| c) Temperatură de incubare prea mică | Incubarea testului ELISA trebuie efectuată la temperatura camerei (22 ± 5 °C). |
| d) Timp de incubare prea scurt | Incubarea plăcii cu conjugat, standarde și probe trebuie să dureze 120 ± 5 minute. Enzyme Substrate Solution trebuie incubată pe placă timp de 30 de minute. |
| e) Filtru necorespunzător utilizat pentru cititorul de plăci | Placa trebuie citită la 450 nm, cu un filtru de referință de la 620 până la 650 nm. |
| f) Reactivii sunt prea reci | Toți reactivii, cu excepția conjugatului concentrat 100X, trebuie aduși la temperatura camerei înainte de începerea testării. Această operațiune durează aproximativ 1 oră. |
| g) Kitul/componentele a(u) expirat | Asigurați-vă că utilizați trusa înainte de data de expirare. Asigurați-vă că standardul și conjugatul concentrat 100X reconstituite sunt utilizate în cel mult 3 luni de la data reconstituirii. |

Fond ridicat

- | | |
|--------------------------------------|---|
| a) Spălare insuficientă a plăcii | Spălați placa de cel puțin 6 ori cu 400 μ l de soluție tampon de spălare pentru fiecare godeu. Pot fi necesare mai mult de 6 cicluri de spălare. Este necesară o perioadă de înmuiere de cel puțin 5 secunde între cicluri. |
| b) Temperatură de incubare prea mare | Incubarea testului ELISA trebuie efectuată la temperatura camerei (22 ± 5 °C). |
| c) Trusa/componentele a(u) expirat | Asigurați-vă că utilizați kitul în perioada de valabilitate. Asigurați-vă că standardul și conjugatul concentrat 100X reconstituite sunt utilizate în cel mult trei luni de la data reconstituirii. |

Comentarii și sugestii





- d) Soluția de substrat enzimatic este contaminată Eliminați substratul dacă acesta se colorează în albastru. Asigurați-vă că utilizați rezervoare curate pentru reactivi.


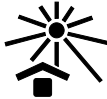

Curbă standard neliniară și variabilitate între duplicate

- a) Spălare insuficientă a plăcii Spălați placa de cel puțin 6 ori cu 400 μl de soluție tampon de spălare pentru fiecare godeu. Pot fi necesare mai mult de 6 cicluri de spălare. Este necesară o perioadă de înmuiere de cel puțin 5 secunde între cicluri.
- b) Eroare la diluarea standardului Asigurați-vă că diluțiile standardului sunt preparate corect, conform acestor instrucțiuni de utilizare.
- c) Omogenizare insuficientă Amestecați bine reactivii prin răsturnarea acestora sau cu mișcări circulare înaintea adăugării lor pe plăcuță.
- d) Tehnică de pipetare inconsecventă sau întrerupere în timpul configurării testului Adăugarea probei și a standardului trebuie efectuată în mod continuu. Toți reactivii trebuie preparați înainte de a începe testul.

Simboluri

În instrucțiunile de utilizare sau pe ambalaj și pe etichete pot apărea următoarele simboluri:

| Simbol | Definiția simbolului |
|---|---|
|  <N> | Conține reactivi suficienți pentru <N> reacții |
|  | Data de expirare |
| IVD | Dispozitiv medical pentru diagnostic in vitro |
| REF | Număr catalog |
| LOT | Număr de lot |
| MAT | Număr de material (adică eticheta componentei) |
| COMP | Componente |
| CONT | Conține |
| NUM | Număr |
| GTIN | Număr de comercializare global articol |
| ECREP | Reprezentanță autorizată |
| Rn | R reprezintă revizuirea Instrucțiunilor de utilizare, iar n este numărul revizuirii |
|  | Limitări de temperatură |
|  | Producător |

| Simbol | Definiția simbolului |
|---|--|
|  | Consultați instrucțiunile de utilizare |
|  | A se păstra ferit de razele soarelui |
|  | Avertisment/atenție |

Date de contact

Pentru asistență tehnică și informații suplimentare, consultați Centrul nostru pentru Asistență Tehnică la adresa www.qiagen.com/Support, apelați numărul de telefon 00800-22-44-6000 sau contactați Departamentele de Servicii Tehnice ale QIAGEN sau distribuitorii locali (a se vedea coperta a patra sau vizitați www.qiagen.com).

Anexa A: Informații tehnice

Rezultate neconcludente

Rezultatele neconcludente sunt rare și pot fi legate de starea imună a individului care este testat, dar pot fi, de asemenea, legate de un număr de factori tehnici (de exemplu, manipularea/depozitarea inadecvate ale tuburilor de recoltare a sângelui, spălare incompletă a plăcii ELISA), dacă instrucțiunile de mai sus nu sunt respectate.

Dacă sunt suspectate probleme tehnice legate de depozitarea reactivului, recoltarea sângelui sau manipularea probelor de sânge, repetați întregul test QFN SARS cu specimene de sânge noi. Repetarea testului ELISA asupra probelor de plasmă stimulată poate fi realizată dacă este suspectată o spălare necorespunzătoare sau vreo abatere de la procedurile testului ELISA. Medicii pot alege să recolteze un nou specimen sau să efectueze alte proceduri, în funcție de caz.

Probe de plasmă coagulate

În cazul în care apar cheaguri de fibrină în urma stocării pe termen lung a probelor de plasmă, centrifugați probele pentru a sedimenta substanța coagulată și a facilita pipetarea plasmei.

Probe de plasmă lipemice

Trebuie acordată atenție la pipetarea probelor lipemice, deoarece depozitele de grăsime pot bloca vârful pipetelor.

Anexa B: Procedura de testare ELISA pe scurt

1. Aduceți componentele trusei ELISA, cu excepția conjugatului concentrat 100×, la temperatura camerei timp de cel puțin 60 de minute.

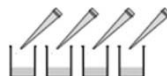


2. Reconstituiți standardul din trusă la o concentrație de 8,0 UI/ml cu apă distilată sau deionizată. Preparați patru (4) diluții ale standardului.

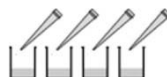


3. Reconstituiți conjugatul concentrat 100× liofilizat cu apă distilată sau deionizată.

4. Preparați conjugatul în concentrație de lucru în Diluant verde și adăugați 50 μl în toate godeurile.



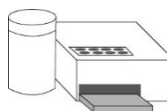
5. Adăugați 50 μl din probele de plasmă pentru testare și 50 μl de standarde în godeurile corespunzătoare. Amestecați folosind agitatorul.



6. Incubați timp de 120 de minute la temperatura camerei.



7. Spălați godeurile de cel puțin 6 ori cu 400 μl de soluție tampon de spălare pentru fiecare godeu.



8. Adăugați 100 μ l de soluție de substrat pentru enzime în godeuri.
Amestecați folosind agitatorul.



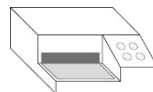
9. Incubați timp de 30 de minute la temperatura camerei.



10. Adăugați 50 μ l de soluție de stopare a enzimelor în toate
godeurile. Amestecați folosind agitatorul.



11. Citiți rezultatele la 450 nm folosind un filtru de referință de 620
până la 650 nm.



12. Analizați rezultatele.



Informații pentru comandă

| Produs | Cuprins | Nr. cat. |
|---|--|----------|
| QuantiFERON SARS-CoV-2 (QFN SARS) ELISA Kit | Kit ELISA cu 2 plăci | 626420 |
| Produse asociate | | |
| QuantiFERON SARS-CoV-2 Blood Collection Tubes | 200 de tuburi (câte 50 din Nil, Ag1, Ag2 și Mitogen) | 626725 |

Pentru informații actualizate privind licențele și clauzele de declinare a răspunderii specifice produselor, consultați ghidul sau manualul de utilizare al kitului QIAGEN respectiv. Ghidurile și manualele de utilizare pentru kiturile QIAGEN sunt disponibile pe www.qiagen.com sau pot fi solicitate de la Serviciile tehnice QIAGEN sau distribuitorul dumneavoastră local.

Istoricul modificărilor documentului

| Data | Descriere |
|--------------------|---|
| R1, octombrie 2021 | Ediție inițială |
| R2, noiembrie 2021 | Actualizarea secțiunilor Caracteristici de performanță și Performanță clinică |
| R3, aprilie 2022 | Actualizarea secțiunii Caracteristici de performanță analitică pentru substanțe de interferență |

Această pagină a fost lăsată necompletată în mod intenționat.

Această pagină a fost lăsată necompletată în mod intenționat.

Această pagină a fost lăsată necompletată în mod intenționat.

Acord de licență limitată pentru QuantiFERON® SARS-CoV-2 (QFN SARS) ELISA Kit

Utilizarea acestui produs înseamnă acceptarea următorilor termeni de către orice cumpărător sau utilizator al produsului:

1. Produsul poate fi utilizat doar în conformitate cu protocoalele furnizate împreună cu produsul și prezentul manual și doar împreună cu componentele incluse în panou. QIAGEN nu acordă nicio licență pentru niciuna dintre proprietățile sale intelectuale în vederea utilizării sau încorporării componentelor incluse în acest panou cu orice componentă care nu este inclusă în acest panou, dacă nu este precizat astfel în protocoalele furnizate împreună cu produsul, în prezentul manual și în protocoalele suplimentare disponibile la adresa www.qiagen.com. Unele dintre aceste protocoale suplimentare au fost furnizate de utilizatorii QIAGEN pentru utilizatorii QIAGEN. Aceste protocoale nu au fost testate riguros sau optimizate de QIAGEN. QIAGEN nu le garantează și nici nu asigură faptul că acestea nu încalcă drepturile terților.
2. În afară de licențele acordate în mod explicit, QIAGEN nu garantează sub nicio formă că acest panou și/sau utilizarea (utilizările) acestuia nu încalcă drepturile terților.
3. Acest panou și componentele sale sunt licențiate pentru o singură utilizare și nu pot fi reutilizate, recondiționate sau revândute.
4. QIAGEN declină în mod specific orice licențe, explicite sau implicite, altele decât cele declarate în mod explicit.
5. Cumpărătorul și utilizatorul panoului acceptă să nu ia măsuri și să nu permită niciunei persoane să ia măsuri care ar putea conduce la sau facilita oricare dintre acțiunile interzise prezentate mai sus. QIAGEN poate pune în aplicare interdicțiile din acest Acord de licență limitată în orice instanță și va recupera toate costurile anchetelor și cheltuielile de judecată, inclusiv onorariile avocaților, în orice acțiune pentru aplicarea acestui Acord de licență limitată sau a oricăruia dintre drepturile sale de proprietate intelectuală legate de panou și/sau componentele acestuia.

Pentru termenii actualizați ai licenței, consultați www.qiagen.com.

Mărci comerciale: QIAGEN®, Sample to Insight®, QuantiFERON® (QIAGEN Group) Proclin®. Denumirile înregistrate, mărcile comerciale etc. utilizate în documentul de față, chiar dacă nu sunt marcate în mod specific, sunt protejate prin lege.

04-22 1124420 © 2022 QIAGEN, toate drepturile rezervate.

